



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND  
MARKENAMT

# Offenlegungsschrift

⑯ DE 199 44 695 A 1

⑯ Int. Cl. 7:

A 61 K 35/84

DE 199 44 695 A 1

⑯ Unionspriorität:

10-263753 17. 09. 1998 JP  
10-323374 13. 11. 1998 JP

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

⑯ Anmelder:

Niwa, Kozo, Tosashimizu, Kouchi, JP

⑯ Vertreter:

Berndt und Kollegen, 81667 München

#### Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität von Rohdrogen, Zusammensetzung enthaltend eine Rohdroge mit verstärkter Antitumor-Aktivität, Verfahren zur Feststellung der Antitumor-Wirksamkeit aufgrund der Behandlung von Rohdrogen und Verfahren zur Ermittlung der Antitumor-Wirksamkeit von Rohdrogen

⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität durch Rösten eines Pilzes, der  $\beta$ -Glucan enthält, mit ferner IR-Strahlung, anschließendes Fermentieren mit "Koji" und daran anschließendes Herstellen eines ölichen Agens. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Zusammensetzung, die eine Rohdroge enthält, auf die ein derartiges Verfahren angewendet worden ist. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren, um zu ermitteln, daß die Antitumor-Aktivität bei oraler Verabreichung größer ist, wenn ein erhöhtes Verhältnis der gebildeten Menge an Lipid-Peroxid groß ist. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Ermittlung der Wirkung der auf die Rohdroge angewendeten Behandlung hinsichtlich der Antitumor-Aktivität.

DE 199 44 695 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Techniken wie Verfahren zum Verstärken und Ermitteln und dergleichen von Antitumor-Aktivität von Rohdrogen wie Pilzen, enthaltend Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Techniken zur Verstärkung der Manifestation von Antitumor-Wirkungen bei der oralen Verabreichung bzw. zum Abschätzen der Wirksamkeit der Antitumor-Aktivität bei der oralen Verabreichung, und dergleichen.

Verschiedene Pilzsorten sind bisher im Bereich der chinesischen Medizin, der -Lebensmittel für die Gesundheit oder dergleichen verwendet worden. Z. B. weiß man, daß Pilze wie GANODERMA (REISHI) (Tomes (SARUNOKOSHI-KAKE)), PORIA (BUKURYO), Maitake-Pilz (MAITAKE, Grifola frondosa Dickson) und dergleichen Antitumor- wie carcinostatische Aktivität etc. haben. Viele Untersuchungen sind über die wirksamen Bestandteile der Pilze mit Antitumor-Aktivität durchgeführt worden, und man hat im allgemeinen gesagt, daß Polysaccharide in den Pilzen wirksame Antitumor-Aktivitäten aufweisen.

Tatsächlich werden im Bereich der chinesischen Medizin getrocknete Pilze ausgekocht und zum inneren Gebrauch durch Trinken der Auskochung verwendet.

Verschiedene Sorten chinesischer Arzneimittel sind bisher als natürliche Medikamente verwendet worden, da sie geringere Nebenwirkungen aufweisen als synthetisch hergestellte Arzneimittel. In dem japanischen Arzneibuch sind eine Anzahl von chinesischen Arzneimitteln als Rohdrogen beschrieben worden.

Andererseits werden die Auskochungen oder Extrakte dieser Pilze bezüglich ihrer Antitumor-Aktivitäten Versuchstieren wie Mäusen etc. zusammen mit Nahrung zugeführt. Mäuse einer Kontrollgruppe, denen das chinesische Arzneimittel nicht zugeführt worden ist, und Mäuse einer Gruppe, denen das chinesische Arzneimittel zugeführt worden ist, werden verglichen und beobachtet, um beispielsweise einen erloschenen Zustand, einen transferierten Zustand von Krebs oder den Prozentsatz von Mäusen bezüglich Vitalität oder dergleichen zu untersuchen, wodurch die Wirksamkeit dieser Pilze inspiziert wird.

Darüber hinaus werden in solchen Versuchstieren auch die Toxizität und die Wirksamkeit untersucht. Nach Bestätigung der Sicherheit von diesen Stoffen bei der Anwendung am Menschen werden diese Arzneimittel tatsächlich oral verabreicht und ihre Wirksamkeit bezüglich Antitumor-Aktivität im Menschen mittels klinischer Tests endgültig bestätigt.

Antitumor-Aktivitäten wie carcinostatische Eigenschaft, krebsübertragungs-inhibierende Eigenschaft etc. von Pilzen sind, wie bereits oben erwähnt, schon bekannt gewesen. Auch ihre Wirksamkeit ist weitgehend bekannt. Sie werden verwendet durch Auskochen eines getrockneten Produkts von Pilzen und Trinken der Auskochung oder durch Mischen eines wirksamen Bestandteils, der mit einem Alkohol extrahiert worden ist, mit anderen Komponenten wie Vitamin-Zubereitungen, um eine Form von Gesundheitsgetränken, Gesundheitsnahrungsmitteln oder medizinischen Wirkstoffen herzustellen.

Bei der für den oralen Gebrauch bestimmten Verabreichung wie Trinken einer Auskochung, wie sie üblicherweise erfolgt, ist der Fall, wo die medizinischen Wirkungen erhalten werden könnten, daß der therapeutische Effekt deutlich zu beobachten ist, unerwartet selten. Mit dem Pilz "Agaricus" (AGARIKUSUTAKE, der auch Agaricus genannt wird), der kürzlich Aufmerksamkeit erregt hat, da er einen großen medizinischen Effekt hat, kann dieselbe Tendenz beobachtet werden. Darüberhinaus gibt es bei dem Pilz Maitake (MAITAKE, Grifola frondosa Dickson), der kürzlich ebenfalls Aufsehen erregt hat, auch nur wenig Möglichkeiten, seine medizinische Wirksamkeit zu beweisen.

Sie zeigen jedoch niemals medizinische Wirkungen, auch wenn es einen Fall gibt, bei dem eine eindeutig wirksame Antitumor-Aktivität gezeigt worden ist, aber dies war nur in einer extrem begrenzten Anzahl von Beispielen der Fall.

Somit überlegte sich der Erfinder der vorliegenden Erfindung, ob es nicht einen wirksamen Weg gäbe, die Antitumor-Aktivitäten von Pilzen für Personen dadurch zu erhalten, daß der Mechanismus erkannt wird, warum Unterschiede bei der Manifestation von Antitumor-Wirkungen aufgrund von Pilzen vorkommen.

Selbst wenn die Wirksamkeit von Pilzen mit Antitumor-Aktivität in Versuchstieren bestätigt worden ist, wie es oben beschrieben worden ist, können die erwarteten Wirkungen in fast keinem der Fälle gezeigt werden, wenn der Pilz tatsächlich für den oralen Gebrauch an Menschen verabreicht wird. Zur Bestätigung dieser Wirkungen durch tatsächlich erfolgende orale Verabreichung in klinischen Versuchen ist es nötig, die Verabreichung über einen bestimmten Zeitraum durch Kontrolle des Verabreichungssystems unter konstanten Bedingungen fortzusetzen und auch die entsprechende Beobachtung fortzusetzen. Somit wird ein erheblicher Zeitaufwand erforderlich, um ein Ergebnis zu erhalten bezüglich der Frage, ob oder ob nicht die Wirkungen der Pilze durch orale Verabreichung an einen Patienten gezeigt werden. So ein Verfahren ist sicherlich wirksam, aber zum Herausfinden einer Substanz mit einer wirksamen Antitumor-Aktivität durch Absuchen einer Vielzahl von natürlichen Produkten ist ein enormer Zeitaufwand erforderlich, so daß es nötig ist, eine Technik zu entwickeln, die die Antitumor-Aktivität innerhalb eines kürzeren Zeitraums ermitteln kann.

Auch kann eine Bestätigung der Wirksamkeit in bezug auf einen bestimmten Patienten nicht durchgeführt werden, wenn der Patient, der unter klinischen Testbedingungen steht, plötzlich Komplikationen verursacht und bei dem Patienten eine Behandlung ohne Kontrolle und eilends vorgenommen werden muß. Somit treten bei einem klinischen Versuch über einen langen Zeitraum eine große Anzahl von Fällen auf, wo die Bestätigung der Wirksamkeit nicht erreicht werden kann, so daß es notwendigerweise nicht einfach ist, den klinischen Versuch über einen langen Zeitraum durchzuführen und gleichzeitig die Effektivität des Tests selbst aufrecht zu erhalten.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat sich überlegt, daß es notwendig ist, ein Verfahren zu entwickeln, das die Manifestation eines Antitumor-Effekts mit einer bestimmten Sicherheit voraussagen läßt, wenn der menschlichen Versuchsperson eine Probe verabreicht wird, ohne einen klinischen Versuch durchzuführen.

Als Substanzen mit Antitumor-Aktivität sind eine große Vielzahl von Materialien, die keine Pilze sind, als Rohdrogen in der chinesischen Medizin bekannt. Es ist besonders bevorzugt, die zuvor im Zusammenhang mit Pilzen genannten Probleme allgemein auf alle Rohdrogen zu übertragen und für alle Rohdrogen auch zu lösen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, Antitumor-Aktivitäten von Rohdrogen wie Pilzen und dergleichen, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivitäten enthalten, wirksam zu entwickeln/verstärken.

Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, Antitumor-Aktivitäten von Rohdrogen wie Pilzen und

dergleichen nach ihrer Verabreichung an Menschen beobachten und messen zu können, ohne klinische Versuche durchzuführen.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Zusammensetzung bereit zu stellen, die Rohdrogen wie Pilze und dergleichen enthält, die wiederum Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthalten, so daß ihre Antitumor-Aktivität wirksam manifestiert werden kann.

Die oben erwähnten und weitere Aufgaben und neuen charakteristischen Merkmale der vorliegenden Erfindung werden in der nachfolgenden Beschreibung im Detail beschrieben.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Verstärken der Antitumor-Aktivität, das angewendet wird auf eine Rohdroge, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthält, das einen Röstschritt, bei dem die oben erwähnte Rohdroge durch ferne IR-Strahlung geröstet wird, und einen Fermentationsschritt umfaßt, bei dem ein Mikroorganismus zugesetzt wird, der die Antitumor-Aktivität der oben erwähnten Rohdroge verstärkt.

Anschließend an den oben genannten Fermentationsschritt umfaßt das Verfahren der vorliegenden Erfindung den Schritt der Herstellung eines ölichen Agens, bei dem die oben erwähnten fermentierten Rohdrogen mit einer ölichen Komponente, erhalten von Pflanzen wie geröstetem Sesam oder dergleichen, mittels ferner IR-Strahlen eingeschlossen werden.

Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem die Verwendung eines Pilzes, der  $\beta$ -Glucan enthält.

Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem die Verwendung von zumindest einem Pilz, ausgewählt aus Agaricus-Pilz (AGARKUSUTAKI, Agaricus blazei), Maitake-Pilz (MAITAKI, Grifola frondosa Dickson), Shiitake-Pilz (SHIITAKI, Cortinarius Shitake), Matsutake-Pilz (MATSUTAKI, Tricholoma matsutake), Shimejitate-Pilz (SHIMEJITAKI; Lyophyllum decastes) und Enokitake-Pilz (ENOKITAKI, Flammulina velutipes).

Wenn der oben genannte Agaricus-Pilz (AGARKUSUTAKI) verwendet wird, umfaßt die vorliegende Erfindung den Schritt, den Pilz im rohen Zustand mit Hilfe ferner IR-Strahlung zu rösten.

Die Zusammensetzung gemäß vorliegender Erfindung, die die in ihrer Antitumor-Aktivität verstärkte Rohdroge enthält, umfaßt eine Rohdroge, auf die das Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität der Rohdroge mit einer der oben erwähnten Konstitutionen angewendet wird bzw. worden ist.

Die vorliegende Erfindung ist ein Verfahren, mit dem die Wirksamkeit ermittelt werden kann, die die Behandlung der Rohdroge, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthält, auf die Antitumor-Aktivität hat. Dieses Verfahren umfaßt den Schritt, die Rohdroge, auf die das oben genannte Behandlungsverfahren anzuwenden ist, zu einem System zu geben, das durch Bestrahlung von ungesättigten Fettsäuren wie Docosahexaen-Säure mit UV-Strahlen Lipid-Peroxide bildet, das durch Bestrahlung auf die Antitumor-Aktivität der Rohdroge hat, dann als groß zu ermitteln, wenn das und den Effekt, den die Behandlung auf die Antitumor-Aktivität der Rohdroge hat, dann als groß zu ermitteln, wenn das Verhältnis der gebildeten Mengen an Lipid-Peroxid relativ zu dem Verhältnis der Konzentrationen der Rohdroge groß ist. Das heißt: wenn Pilz A bei einer Konzentration von 1% die Menge a an Lipid-Peroxid und bei einer Konzentration von 2% eine Menge von mehr als 2a an Lipid-Peroxid erzeugt, dann kann dieser Pilz A als ein Pilz mit einem wirksamen Antitumor-Effekt ermittelt werden, wenn er oral verabreicht wird. Insbesondere ist der Pilz A im Vergleich zu Pilz B, der bei einer Konzentration von 1% die Menge a an Lipid-Peroxid und bei einer Konzentration von 2% nur eine Menge von 2a an Lipid-Peroxid erzeugt, eine wirksamere Antitumor-Substanz.

Die vorliegende Erfindung umfaßt Pilze, die  $\beta$ -Glucan enthalten, und die als die oben genannte Rohdroge verwendet werden kann.

Die vorliegende Erfindung ist ein Verfahren zum Ermitteln der Wirksamkeit der Rohdroge zur Ermittlung der Wirksamkeit eines Antitumor-Effekts der Rohdroge, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthält, ohne klinische Versuche durchzuführen.

Das Verfahren umfaßt die Schritte, die Rohdroge zu einem System zu geben, das durch Bestrahlung einer ungesättigten Fettsäure wie Docosahexaen-Säure mit UV-Strahlen Lipid-Peroxide zu bilden, und den Effekt der Behandlung für die Verstärkung der Antitumor-Aktivität bei oraler Verabreichung der oben erwähnten Rohdroge zu ermitteln und nach oben beschriebenem Kriterium zu beurteilen (Verdopplung der Pilz-Konzentration bringt verdoppelte oder mehr als verdoppelte Menge an Lipid-Peroxid).

Die vorliegende Erfindung umfaßt die Anwendung von beiden oben beschriebenen die Antitumor-Aktivität verstärkenden Verfahren auf die oben genannten Rohdrogen.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat verschiedene Studien an einer Substanz in chinesischen Arzneimitteln vorgenommen, die aktiven Sauerstoff inhibiert, und mittels dieser Studien hat er bestätigt, daß aktiver Sauerstoff oder Lipid-Peroxide bemerkenswerte Wirkungen auf den menschlichen Körper haben. Diese Substanzen betreffen das Brechen von Geweben im menschlichen Körper, wodurch sie die Ursache von verschiedenen Infektionskrankheiten werden.

In den Geweben des menschlichen Körpers besteht ein Enzym, das SOD (Superoxid Dismutase) genannt wird, und das die Gewebe des menschlichen Körpers vor aktivem Sauerstoff schützt und den aktiven Sauerstoff entfernt. Die Menge an SOD sinkt mit zunehmendem Alter, so daß die Entfernung des aktiven Sauerstoffs im Körper nicht mehr erfolgen kann. Die Abnahme des Enzyms ist besonders bemerkenswert ab dem Alter von 40 oder mehr, und die Entfernung des aktiven Sauerstoffs, der vom Körper aufgenommen wird, kann nicht mehr in ausreichender Weise erfolgen. In den vergangenen Jahren ist klargestellt worden, daß der aktive Sauerstoff Ursache für verschiedene Arten von Krankheiten bei Erwachsenen ist.

Wenn überschüssiger aktiver Sauerstoff im Körper gebildet wird, durch chronische oder akute Stimulation oder durch eine chemische Substanz etc., kann die Entfernung des aktiven Sauerstoffs auch nicht mit Hilfe der Menge an SOD, die von Beginn an im Körper vorliegt, in ausreichender Menge erfolgen, so daß die Person an verschiedenen Krankheiten leidet.

Somit hat man gedacht, daß bei verschiedenen Krankheiten, verursacht durch nicht genügenden Abtransport des aktiven Sauerstoffs aufgrund fehlender SOD, daß die Behandlung durch Verabreichung von SOD wirksam sein müßte, um den Mangel an SOD zu beheben. Aufgrund einer derartigen Behandlungsmethode können Wirkungen im Falle einer Infektionsmedizin erzielt werden, jedoch können keine bemerkenswerten Wirkungen erzielt werden im Fall der oralen Verabreichung, so daß es der derzeitige Status ist, daß die Wirkungen noch nicht nachgewiesen worden sind.

Bezüglich des Punktes, daß die Wirkungen bei oraler Verabreichung nicht manifestiert worden sind, hat der Erfinder der vorliegenden Erfindung herausgefunden, daß SOD gegenüber dem Magensaft instabil ist, das Molekulargewicht von SOD 30.000 oder höher ist, und daß die Instabilität darauf zurückzuführen ist, daß die SOD von den Verdauungsorganen als solchen nicht absorbiert wird. Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat auch gefunden, daß es eine Einschränkung dahingehend gibt, daß die SOD nur auf Superoxid ( $O_2^-$ ) als einer der vier existierenden Formen aktiven Sauerstoffs wirkt.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat gewissenhafte Studien über Substanzen durchgeführt, die überschüssigen aktiven Sauerstoff im menschlichen Körper entfernen können und geeignet sind zur oralen Verabreichung. Als ein Ergebnis hat er eine Zusammensetzung herausgefunden, die Pflanzenöl, erhalten von gerösteten Pflanzen, enthält, die einer 10 Substanz zugesetzt wird, erhalten durch Rösten von Pflanzensamen oder ihrer Keime unter geeigneten Bedingungen, und die anschließend fermentiert wird durch Zugabe von Mikroorganismen. Diese Zusammensetzung kann als Mittel zur Entfernung von aktivem Sauerstoff verwendet werden, das auch bei der oralen Anwendung wirksam ist (siehe japanisches Patent 2 125 887).

In den oben genannten Pflanzensamen oder ihren Keimen liegen aktiven Sauerstoff supprimierende bzw. bekämpfende 15 Substanzen niedrigen Molekulargewichts inhärent vor. Beispiele sind Flavonoide, Polyphenole, Tannin, Tocopherol, Vitamin B<sub>2</sub>, etc. Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat gefunden, daß solche gegen aktiven Sauerstoff gerichteten Substanzen niedrigen Molekulargewichts chemisch wechselseitig oder mit der anderen Komponente binden, durch Adsorption oder Inklusion eine molekulare Verbindung erzeugen oder einen komplizierten Komplex oder eine makromolekulare Verbindung bilden, und daß diese bei Einnahme in dieser Form keine den aktiven Sauerstoff supprimierende 20 Wirkung zeigen, die man für eine gegen aktiven Sauerstoff gerichtete Substanz niedrigen Molekulargewichts erwarten könnte.

Das heißt, selbst wenn die Substanz in einer derartigen Form eingenommen wird, können viele Menschen heutzutage die gegen aktiven Sauerstoff gerichtete Substanz mittels Magensaft nicht zu einer Substanz geringen Molekulargewichts abbauen, so daß die den aktiven Sauerstoff unterdrückende Wirkung nicht erhalten werden kann. Der Erfinder der vorliegenden Erfindung stellt dies in seiner Publikation "Food Industry", Band 35, Nr. 14, "Development and Improvement of DDS, SOD-like Function Foods from Natural Plants and Seeds and Their Pharmacological and Biochemical Consideration" fest.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung stellte Untersuchungen an, um die oben erwähnten gegen aktiven Sauerstoff gerichteten Substanzen, die in Pflanzensamen oder ihren Keimen vorliegen, für die Behandlung oder Prävention von 30 Krankheiten wirksam zu nutzen und wie der oben beschriebene Zustand der gegen aktiven Sauerstoff gerichteten Substanzen zu aktivieren ist.

Als Ergebnis hat er herausgefunden, daß die gegen aktiven Sauerstoff gerichteten Substanzen in den Pflanzensamen oder ihren Keimen durch Erhitzen und Rösten der Pflanzensamen oder Keime unter milden Bedingungen aus dem oben beschriebenen Komplex unter Bildung einer Substanz mit ursprünglich geringem Molekulargewicht partiell freigesetzt oder partiell aktiviert werden durch Erzeugung einer aktiven funktionellen Gruppe aufgrund einer chemischen Veränderung. Durch das Einwirken dieser Behandlungen wird die gegen aktiven Sauerstoff gerichtete Substanz in ihrer Wirkung wesentlich verstärkt im Vergleich zu der Substanz, wie sie vor dem Rötvorgang existierte.

Andererseits glaubt man, daß viele der antitumor-aktiven Funktionen, wie die carcinostatische Eigenschaft oder die Eigenschaft von Pilzen, den Krebs-Transfer zu inhibieren, im allgemeinen auf Polysaccharide wie  $\beta$ -Glucan etc. zurückzuführen sind.  $\beta$ -Glucan ist jedoch verschieden von den oben genannten gegen aktiven Sauerstoff wirksamen Substanzen geringen Molekulargewichts, wie sie in den Pflanzensamen oder Keimen enthalten sind, und liegt außerhalb der Aufgabe der oben beschriebenen Reihenuntersuchungen mit aktivem Sauerstoff durch den Erfinder der vorliegenden Erfindung.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung stellte jedoch fest, daß die Antitumor-Wirkungen der Pilze bei oraler Verabreichung durch Trinken einer Auskochung bei einigen Personen signifikante Wirkungen zeigten. Dies galt jedoch nicht für viele andere Menschen, so daß der Erfinder in Betracht zog, dies mit der Tatsache des geringen Molekulargewichts der oben erwähnten gegen aktiven Sauerstoff gerichteten Substanz zu erklären.

Das heißt, während Wirkung und Mechanismus von  $\beta$ -Glucan, das Antitumor-Aktivität zeigt, noch nicht ausreichend aufgeklärt worden sind, wie es oben bereits dargelegt worden ist, bedeutet die Tatsache, daß es Unterschiede beim Auftreten von Antitumor-Wirkungen gibt, wenn Pilze für den oralen Gebrauch aufgenommen werden, daß es Patienten gibt, auf die der wirksame Bestandteil der Pilze, der die Antitumor-Aktivität manifestiert, leicht wirkt. Andererseits gibt es jedoch auch Patienten, auf den dieser Bestandteil kaum wirkt.

Gemäß der für den oralen Gebrauch bestimmten Form der Verabreichung werden die Pilze, die aufgenommen werden, früher oder später mit Magensaft behandelt. Dementsprechend hat sich der Erfinder der vorliegenden Erfindung überlegt, daß die Tatsache, ob der wirksame Bestandteil, der die Antitumor-Aktivität der obenerwähnten Pilze manifestiert, wirklichsam ist oder nicht, im Wesentlichen von einer solchen Behandlung mit Magensaft abhängt. Das heißt, der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat sich überlegt, daß es individuelle Unterschiede bei der Behandlung durch Magensaft geben muß, und diese individuellen Unterschiede müßten verantwortlich sein für die Unterschiede bei der Manifestation der Antitumor-Wirkungen.

Somit hat der Erfinder der vorliegenden Erfindung angesichts der klinischen Tatsache, daß es individuelle Unterschiede in der Stärke der Magensaft gibt, die folgende Hypothese entwickelt zwischen der Leichtigkeit bezüglich der Manifestation von Antitumor-Wirkung bei innerer Verabreichung und der Behandlung mit Magensaft.

Das heißt, der wirksame Bestandteil mit Antitumor-Aktivität, der in Pilzen enthalten ist, und der einer Behandlung mit Magensaft unterworfen wird, existiert in einem Zustand, bei dem die Wirkungen sich nur unter Schwierigkeiten manifestieren. Wie oben erwähnt, verändert sich der Bestandteil in einen Zustand, bei dem die Wirkungen leicht zu manifestieren sind aufgrund der Behandlung mit Magensaft, wobei es bei den einzelnen Individuen Unterschiede gibt. Das heißt, wenn eine Person natürlicherweise einen starken Magensaft hat, nimmt der Bestandteil mit den Wirkungen auf die Antitumor-Aktivität, die in den aufgenommenen Pilzen enthalten ist, einen Zustand an, bei dem die Wirkung leicht gezeigt werden kann, wodurch die Antitumor-Wirkungen manifestiert werden.

Bei Personen jedoch, die natürlicherweise einen schwachen Magensaft haben, wird der Bestandteil mit den Wirkungen auf die Antitumor-Aktivität nicht den Zustand annehmen, bei dem die Wirkung auf einfache Weise gezeigt werden kann, wodurch die Antitumor-Wirkungen nicht so klar manifestiert werden.

Viele Personen haben heutzutage keinen starken Magensaft, der den Wechsel des wirksamen Bestandteils mit der Antitumor-Aktivität von Pilzen in einem Ausmaß bewirken kann, daß die Wirkung davon ohne weiteres manifestiert wird. Ergebnis davon ist, daß man davon ausgehen kann, daß sich nicht viele Beispiele, die die Wirksamkeit der Antitumor-Aktivität von Pilzen mit einem bestimmten Ausmaß bestätigen, durch innere Verabreichung beobachten lassen.

Das heißt, es läßt sich erklären, daß, im Fall einer Person mit einem natürlicherweise starken Magensaft, die Bestandteile durch den Magensaft gespalten werden, so daß die wirksamen Bestandteile in die freie aktivierte Form überführt werden, wodurch die Antitumor-Aktivität im Körper gezeigt werden kann, während die Bestandteile, die für die Antitumor-Aktivität in den Pilzen wirksam sind, beispielsweise auf Grund von Polymerisation wie eine Kette Hand in Hand (wobei dies ein Ausdruck des Vergleichs ist), und im unbeweglichen Zustand, d. h., im nicht aktiven Zustand, in dem sie nicht aktivieren können, vorliegen.

Man kann davon ausgehen, daß heutzutage viele Personen die Kette in dem inaktivierten Zustand, in dem die wirksamen Bestandteile, die auf den Krebs wirken, miteinander als eine Kette verbunden sind, mit ihren Magensaften nicht spalten können. Das ist die Erklärung dafür, daß der auf den Krebs wirkende Bestandteil in einem solchen nicht-aktivierten Zustand vom Darm absorbiert wird, und daß er daher seine Wirkung im Körper nicht zeigen kann.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat sich überlegt, daß eine Behandlung, die den wirksamen Bestandteil, der in dem nicht-aktivierten Zustand vorliegt, zuvor aktiviert und auf einfache Weise bei Pilzen angewandt werden kann, das oben genannte Problem lösen können sollte.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat verschiedene Mittel versucht, um die wirksamen Bestandteile in ihrem nicht aktiven Zustand zu aktivieren. Aber es ist ihm nicht ohne Weiteres gelungen, wirksame Maßnahmen zu ergreifen. Das beruht darauf, daß ausreichendes Wissen über den Zustand der wirksamen Bestandteile, die in dem nicht-aktivierten Zustand vorliegen, nicht erhalten werden können, da das tatsächlich existierende System viel zu komplex ist für eine Ermittlung.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat verschiedenen Experimente durchgeführt. Als letztes Experiment versuchte er, das von ihm selbst erfundene und oben beschriebene Verfahren als aktivierendes Mittel auf aktiven Sauerstoff-supprimierende Substanzen wie Flavonoide, Polyphenole etc., also Substanzen, die sich ziemlich von  $\beta$ -Glucan unterscheiden, anzuwenden.

Wenn solch ein Verfahren anzuwenden ist, sollen Flavonoide aktiviert werden. Die zu behandelnden Substanzen (Flavonoide) sind dabei ziemlich verschieden von  $\beta$ -Glucan, so daß der nicht-aktivierte Zustand möglicherweise ganz anders ist. Deshalb sah es am Anfang danach aus, als wäre eine Änderung des Verfahrens zur Aktivierung von  $\beta$ -Glucan schwierig.

Die experimentellen Ergebnisse waren jedoch völlig anders als die Erwartungen des Erfinders der vorliegenden Erfindung dies vermuten ließen. Die Ergebnisse zeigten, daß die Mittel zur Aktivierung der den aktiven Sauerstoff-supprimierenden Substanzen wie der Flavonoide etc. auch wirksam waren für eine Veränderung von  $\beta$ -Glucan, um dieses zu aktivieren. Und dies, obwohl  $\beta$ -Glucan eine ganz andere Struktur aufweist, als die den aktiven Sauerstoff-supprimierenden Substanzen wie die Flavonoide etc..

Das heißt, der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat herausgefunden, daß bei der experimentellen Verwendung von Pilzen, die zuvor mittels ferner IR-Strahlung geröstet worden waren, die Antitumor-Wirkungen nach der oralen Verabreichung der Pilze verbessert sind relativ zu denen infolge oraler Verabreichung nicht-gerösteter Pilze. Er hat außerdem herausgefunden, daß die mit ferner IR-Strahlung gerösteten Pilze besonders verbesserte Antitumor-Wirkungen aufweisen, wenn sie durch Zugabe von Mikroorganismen, insbesondere "Koji" (*Aspergillus oryzae*) oder Hefe, fermentiert werden.

Als Pilze können Pilze verwendet werden, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthalten. Beispiele für solche Pilze sind der Pilz *Agaricus (AGARIKUSUTAKE)*, der kürzlich aufgrund seiner medizinischen Wirkungen besondere Aufmerksamkeit erregt hat. Außerdem können Pilze verwendet werden, von denen man bisher gesagt hat, daß sie eine gute Antitumor-Aktivität haben. Beispiele dafür sind Fomes (*SARUNOKOSHIKAKE*), Poria (*BUKURYO*), etc.

Zufälligerweise ist herausgefunden worden bezüglich des Pilzes *Agaricus (AGARIKUSUTAKE)*, daß ein ausreichender Effekt selbst dann nicht erzielt werden kann, wenn die ferne IR-Strahlung zum Rösten und die Fermentationsbehandlung unter verschiedenen Bedingungen nach der Ernte und dem Trocknen der Pilze durchgeführt werden. Deshalb wird dieser Pilz vorzugsweise unter nicht-getrockneten Bedingungen der Behandlung unterworfen. Das heißt, der Pilz wird im rohen Zustand, beispielsweise ohne lang nach dem Ernten liegen zu bleiben, verarbeitet.

Darüberhinaus verdärkt der Pilz *Agaricus (AGARIKUSUTAKE)* relativ leicht. Deshalb darf der Pilz nicht zu lange in dem rohen Zustand verbleiben, ehe die Behandlung zum Rösten mit ferner IR-Strahlung erfolgt. Deshalb ist es in einem solchen Fall bevorzugt, den Pilz bei niedriger Temperatur in einem Kühlschrank zu lagern und die Behandlung zum Rösten mit ferner IR-Strahlung innerhalb von 3 Tagen durchzuführen.

Außerdem ist herausgefunden worden, daß die Antitumor-Wirkungen verbessert werden, wenn das nach dem Röstvorgang und der Fermentation erhaltene Material zusätzlich einer ölichen Behandlung unterzogen wird. Beispielsweise wird eine ölige Komponente, erhalten von Pflanzen wie Sesam etc. und mittels ferner IR-Strahlung geröstet, zugegeben, so daß das resultierende Material nach der Fermentationsbehandlung mit der Öl-Komponente beschichtet ist.

Wie oben beschrieben hat der Erfinder anfänglich niemals erwartet, daß die Maßnahmen zur Umwandlung von gegen aktiven Sauerstoff gerichteten Substanzen in Pflanzensamen oder Keimern in eine Verbindung mit niedrigem Molekulargewicht auch wirksam anzuwenden ist, um die Antitumor-Aktivität von Pilzen, die Polysaccharide mit Antitumor-Wirkungen aufweisen und die ganz andere Strukturen haben als die gegen aktiven Sauerstoff gerichteten Substanzen, zu manifestieren. Es ist jedoch klar, daß signifikante Wirkungen dadurch erzielt werden können, daß die oben beschriebene Behandlung mit dem Material durchgeführt wird, und dies ist die vorliegende Erfindung.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat auch gefunden, daß eine beachtenswerte Antitumor-Aktivität dadurch

manifestiert werden kann, daß die oben beschriebene Behandlung auf Pilze angewandt wird, die aufgrund ihrer Antitumor-Aktivität keine besondere Aufmerksamkeit erregt haben. Beispielsweise ist gefunden worden, daß der Pilz Maitake (MAITAKE; Grifola frondosa Dickson) eine Antitumor-Wirkung vergleichbar oder sogar stärker der von dem Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKI) aufweist, wenn er dem Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung und der anschließenden fermentationsbehandlung mittels Mikroorganismen unterworfen wird.

Die Antitumor-Wirkung von Pilzen wie dem Pilz Maitake (MAITAKE; Grifola frondosa Dickson) ist bereits bekannt gewesen, aber es war nicht bekannt, daß dieser Pilz eine Wirkung hat, die vergleichbar ist mit der des Pilzes Agaricus (AGARIKUSUTAKI), der nun Aufmerksamkeit erregt hat. Durch Anwendung des erfundungsgemäßen Verfahrens auf Pilze, wie den Pilz Maitake (MAITAKE; Grifola frondosa Dickson), die inhärente Antitumor-Wirkungen aufweisen, werden diese Wirkungen in ausreichendem Ausmaß manifestiert, so daß eine dem Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKI) vergleichbare Antitumor-Aktivität gezeigt werden kann.

Das heißt, eine potentielle Antitumor-Aktivität von Pilzen konnte bis heute nicht in ausreichendem Maße gezeigt und ihre Wirkung nicht klar bestätigt werden. Durch die Wirkung des vorliegenden erfundungsgemäßen Verfahrens auf Pilze werden die Antitumor-Aktivitäten jedoch klar nachgewiesen, und die Antitumor-Aktivität kann in einem niemals erwarteten Ausmaß manifestiert werden.

In allen Pilzen ist  $\beta$ -Glucan mehr oder weniger enthalten. Die oben beschriebene Behandlung wird als ein Verfahren angesehen, das in der Lage ist, die Wirkung von  $\beta$ -Glucan und auch die Manifestation deutlich zu verstärken. Somit wird die Behandlung der vorliegenden Erfindung nicht nur auf den Pilz Maitake (MAITAKE; Grifola frondosa Dickson), sondern auch auf andere Pilze angewendet, die gewöhnlicherweise als Rohmaterial für Mahlzeiten verwendet worden sind. Beispiele solcher Pilze sind der Pilz Shiitake (SHIITAKE; Lentinus edodes), der Pilz Matsutake (MATSUTAKE; Tricholoma matsutake), der Pilz Shimejitake (SHIMEJITAKE; Lyophyllum decastes), der Pilz Enokitake (ENOKITAKE; Flammulina velutipes), etc. Als Ergebnis wurde herausgefunden, daß das erfundungsgemäße Verfahren in diesen Pilzen enthaltene potentielle Antitumor-Aktivität stark entwickeln kann.

Wenn das oben beschriebene Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität von Pilzen durchgeführt wird, kann das  $\beta$ -Glucan der Pilze, das überlicherweise auf einfache Weise verfügbar ist, ohne Verwendung von teuren und seltenen Pilzen aktiviert werden. Und selbst wenn der Gehalt an  $\beta$ -Glucan geringer ist als der Gehalt an  $\beta$ -Glucan bei seltenen Pilzen, kann eine deutlich wirksamere Antitumor-Aktivität entwickelt werden als in dem Fall, da die seltenen Pilze mit den herkömmlichen Verfahren behandelt werden. Das führt zu einer Reduzierung der wirtschaftlichen Belastung eines Patienten.

Auch wird die Pilze enthaltende Zusammensetzung, auf die ein derartiges die Antitumor-Aktivität verstärkendes Verfahren angewendet worden ist, bezüglich ihrer Antitumor-Aktivität deutlich verbessert im Vergleich zu der konventionellen Zusammensetzung, bei der Pilze, denen eine Antitumor-Aktivität nachgesagt wird, lediglich getrocknet, pulverisiert und gemischt werden.

Darüberhinaus werden die Pilze im Laufe der Durchführung der oben erwähnten Untersuchungen an Pilzen durch schrittweise Erhöhung ihrer Konzentration zu dem System gegeben, in welchem Lipid-Peroxid durch Bestrahlung von ungesättigten Fettsäuren wie Docosahexaen-Säure etc. mit UV-Strahlen gebildet wird. Die Mengen der gebildeten Lipid-Peroxide werden für die jeweiligen Pilze bei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Als Ergebnis wurde herausgefunden, daß die Stärke der Antitumor-Wirkung aufgrund oraler Verabreichung umso größer ist, je größer das Ausmaß der Erhöhung der Bildung von Lipid-Peroxiden durch die Pilze ist.

Das heißt, verschiedene Arten von Pilzen werden dem System, das die oben genannten Lipid-Peroxide bildet, in der selben Konzentration zugesezti, und die Menge an jeweils gebildeten Lipid-Peroxiden wird gemessen. Wenn die Menge des gebildeten Lipid-Peroxids größer ist, können die Antitumor-Wirkungen besser nachgewiesen werden nach tatsächlich erfolgter oraler Verabreichung.

Wenn ein solches Verfahren angewendet wird, kann ohne tatsächlich erfolgte orale Verabreichung abgeschätzt werden, ob die Antitumor-Wirkungen nach oraler Verabreichung der Pilze manifestiert werden oder nicht. Selbst wenn ein klinischer Versuch an einem Patienten mit oraler Verabreichung nicht durchgeführt wird, kann das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung dennoch als ein Verfahren verwendet werden, um die Antitumor-Wirksamkeit (oder Effektivität) durch orale Verabreichung abzuschätzen.

Darüberhinaus werden beispielsweise verschiedene Arten der Behandlung auf Pilze angewendet. Die Antitumor-Wirksamkeit der jeweiligen Behandlung kann ermittelt werden, indem die gebildete Menge an Lipid-Peroxid nach Zusatz der Pilze nach erfolgter jeweiliger Behandlung verglichen wird.

Auch wenn die oben gegebenen Erklärungen bezüglich Pilzen gemacht worden sind, so kann das erfundungsgemäße Verfahren dennoch auch auf Polysaccharide mit Antitumor-Wirkung enthaltende Rohdrogen angewendet werden, die keine Pilze sind. Die Anwendung auf alle Rohdrogen, die  $\beta$ -Glucan enthalten, ist wirkungsvoll.

Das Verfahren kann auf andere Rohdrogen als Pilze angewendet werden. Beispiele für natürlich vorkommende Rohdrogen sind solche, die aus Pflanzen, aus Tieren oder aus Mineralien stammen. Auch viele chinesische Arzneimittel verwenden natürlich gewachsene Rohdrogen, aber es können auch Rohdrogen sein, die in einer Farm unter geeigneten Bedingungen gezüchtet worden sind. Sie können auch in einer artifiziellen Kultur, wie in einer Wasserkultur, gezogen werden sein.

Darüberhinaus können Rohdrogen verwendet werden, auch wenn es andere Rohdrogen sind als die z. B. in dem japanischen Arzneibuch etc. beschriebenen, sofern sie eine wirksame Antitumor-Aktivität zeigen, wenn das Verfahren der vorliegenden Erfindung auf sie angewandt worden ist. Solche Naturprodukte oder Kulturgreide können als Rohdrogen gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Im Nachfolgenden werden Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung unter Bezugnahme auf die Beispiele genauer beschrieben. Bezüglich des Verfahrens zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität von Rohdrogen, der Zusammensetzung, die in ihrer Antitumor-Aktivität verstärkte Rohdrogen enthält, des Verfahrens zur Ermittlung der Antitumor-Wirksamkeit der Behandlung der Rohdroge und des Verfahrens zur Ermittlung der Antitumor-Wirksamkeit von Rohdrogen werden Erklärungen gemacht unter Verwendung von Pilzen, die bekannterweise Rohdrogen sind, die  $\beta$ -Glucan enthalten werden.

halten, ein Polysaccharid mit Antitumor-Aktivität.

## AUSFÜHRUNGSFORM 1

In Ausführungsform 1 der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität von Rohdrogen und eine Zusammensetzung, die in ihrer Antitumor-Aktivität verstärkte Rohdrogen enthält, beschrieben. Bei dem die Antitumor-Aktivität verstärkenden Verfahren von Rohdrogen werden  $\beta$ -Glucan enthaltende Pilze als erstes mittels ferner IR-Strahlen geröstet. Anschließend werden Mikroorganismen wie "Koji" etc. dazugegeben und eine Fermentation unter vorbestimmter Feuchtigkeit und Temperatur durchgeführt. Nach Beendigung des Fermentationsschrittes wird das resultierende Material geeigneterweise zu einem feinen Pulver verarbeitet. Das feine Pulver wird mit einer ölichen Komponente beschichtet, wobei die ölige Komponente erhalten wird durch Drücken und Pressen von Sesam, der zuvor mittels ferner IR-Strahlung zur Herstellung eines ölichen Agens geröstet worden ist.

Das Material, das erhalten wird durch sukzessives Behandeln der das  $\beta$ -Glucan enthaltenden Pilze in dem oben erwähnten Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung, mit der Fermentationsbehandlung mit Mikroorganismen und mit dem Schritt der Herstellung eines ölichen Agens, wird zu einer Zusammensetzung, die eine wirksame Antitumor-Aktivität bei oraler Verabreichung aufweist, wenn sie Pilze enthält, auf die das Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung angewendet worden ist.

Im Nachfolgenden wird die oben beschriebene Erfindung unter Bezugnahme auf die Beispiele genauer erklärt.

## BEISPIEL 1

20

Pilze, die in den nachfolgend beschriebenen Beispielen verwendet worden sind, sind Pilze, die  $\beta$ -Glucan enthalten. Bevorzugt sind insbesondere solche Pilze, die große Mengen an  $\beta$ -Glucan enthalten und im allgemeinen Antitumor-Wirkungen aufweisen, so daß die Antitumor-Wirkungen stark manifestierbar sind.

In diesem Beispiel wurden die folgenden Pilze verwendet: PORIA (BUKURYO), der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), POLYPORUS (CHOREIMATTAKE; Polyporus umbellatus FRIES), der Pilz Maitake (schwarz, MATTAKE, Grifola frondosa Dickson), der Pilz Matsutake (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake) und der Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake). Was den Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) betrifft, hat der Erfinder der vorliegenden Erfindung durch seine Experimente herausgefunden, daß er eine potente Antitumor-Aktivität aufweist, wenn er im Rohzustand verwendet wird, und daß diese Aktivität größer ist, als wenn der Pilz nach Trocknung verwendet wird. Dementprechend wurde der Pilz bei geringen Temperaturen (4°C) im Kühlschrank verwahrt, nachdem er geerntet worden ist, und innerhalb von drei Tagen nach dem Ernten verwendet.

Was die anderen Pilze betrifft, wurden keine so signifikanten Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit beobachtet, wenn sie im Rohzustand bzw. im getrockneten Zustand verwendet wurden (der getrocknete Zustand ist der, in dem diese Pilze als chinesische Medizin bereitgestellt worden sind und auf den das Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung angewendet wird), so daß in dem vorliegenden Beispiel getrocknete Materialien verwendet wurden von den Pilzen PORIA (BUKURYO), POLYPORUS (CHOREIMATTAKE, Polyporus umbellatus FRIES), dem Pilz Maitake (schwarz, MATTAKE, Grifola frondosa Dickson), dem Pilz Matsutake (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake) und dem Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake).

Genäß der vorliegenden Ausführungsform wurden zwei Sorten von Maitake-Pilzen verwendet. Die eine Sorte wird in Japan produziert, und zwar im wesentlichen kultiviert in der Präfektur Niigata, die ein Schneegebiet ist, so daß dieser Pilz offiziell als Pilz Maitake Schneegebiet (Yukiguni maitake) oder als schwarzer Pilz Maitake (Kuromaitake) bezeichnet wird. In der vorliegenden Beschreibung wird dieser Pilz als Pilz Maitake (schwarz) bezeichnet.

Andererseits wird der Pilz Maitake (MATTAKE, Grifola frondosa Dickson), der in China erhalten wird, in der vorliegenden Erfindung als POLYPORUS (CHOREIMATTAKE, Polyporus umbellatus FRIES) bezeichnet. Er wird in der vorliegenden Anmeldung, sofern dies erforderlich ist, von dem oben genannten Pilz Maitake (schwarz) unterschieden. Insbesondere wird von POLYPORUS (CHOREIMATTAKE, Polyporus umbellatus FRIES) hauptsächlich die Wurzel verwendet.

Der erste Schritt des Verfahrens zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität gemäß vorliegendem Beispiel ist ein Rötvorgang unter Verwendung von ferner IR-Strahlung, bei dem die oben genannten Pilze mittels ferner IR-Strahlung geröstet werden. Die zu verwendenden fernen IR-Strahlen sind vorzugsweise ferne IR-Strahlen einer Wellenlänge von etwa 4–14  $\mu$ m. Die Pilze werden unter Verwendung einer Apparatur wie einer Pfanne, einem Ofen etc. geröstet, wobei die innere Oberfläche der Pfanne bzw. des Ofens mit Keramiken, die ferne IR-Strahlung mit einer Wellenlänge des oben angegebenen Bereichs abstrahlen, beschichtet ist. Die Herstellung der Apparatur (der Pfanne, des Ofens etc.) erfolgt durch Mischen eines keramischen Pulvers von Metalloxiden, das ferne IR-Strahlung emittiert, mit Steinen, Kies, Sand etc.

Um einen derartigen Rötvorgang zu bewirken, werden andere Pilze als der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) verwendet, die einmal getrocknet worden sind, und so in der üblichen chinesischen Medizin verwendet werden. Was den Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) betrifft, so wird dieser, wie bereits zuvor erwähnt, im Rohzustand verwendet.

Die oben genannten Pilze werden in der beschriebenen Apparatur geröstet. Zum Beispiel erfolgt der Rötvorgang in einem irdenen Topf, hergestellt aus Substanzen, die ferne IR-Strahlung emittieren. Dazu zählen Granit, Keramiken, Tenshouseki-Stein, etc. und andere ferne IR-Strahlen mit einer Wellenlänge von 4–14  $\mu$ m emittierende Substanzen. In diesen Apparaturen werden die Pilze unter allmählichem Rühren 30–90 Minuten erwärmt, nicht jedoch verbrannt (gebrannt).

Das Verfahren des Röstens ist nicht auf das oben beschriebene Verfahren beschränkt. Es kann jedes Verfahren sein, so lange es die Freisetzung von  $\beta$ -Glucan aus Pilzen fördert. Beispielsweise kann als Quelle der fernen IR-Strahlen zusätzlich zu den oben genannten Apparaturen auch jede andere Apparatur verwendet werden, solange sie ein Material enthält, das ferne IR-Strahlen mit einer Wellenlänge von 4–14  $\mu$ m emittiert. Ein Beispiel dafür sind Platin-Fiber (Fasern), die elektromagnetische Wellen emittieren.

Nach einem derartigen Rötvorgang mittels ferner IR-Strahlung wird ein zweiter Schritt durchgeführt, nämlich der Fermentationsschritt. Unter Verwendung von Fermentationsbakterien wie "Koji" oder Hefe wird die Fermentation in einem Raum mit einer bestimmten Feuchtigkeit bei 30-36°C 48-72 Stunden durchgeführt. Um die Fermentationszeit zu verkürzen, kann eine Fermentationsapparatur verwendet werden.

Als für die Fermentation zu verwendende Mikroorganismen können auch andere Mikroorganismen als "Koji" verwendet werden. Um die Fermentation zu bewirken, kann zusätzlich zu "Koji" auch eine Substanz mit Fermentations-Vermögen verwendet werden. Beispiele dafür sind reife Papaya, Ananassaft, die Rinde einer Feige, die Schale einer Traube, die Rinde eines jungen Bananen, etc. Darüberhinaus können verdauende Enzyme wie Diastase, Pankreatin, etc. von Mikroorganismen stammende proteolytische Enzyme wie Protease, Pepsin, Trypsin, etc., lytische Enzyme von Polysacchariden wie Hemicellulase oder eine Vorläufer-Substanz, die die oben genannten verdauenden oder proteolytischen Enzyme etc. bildet, verwendet werden.

Bevorzugte Ergebnisse können jedoch dann erzielt werden, wenn die Fermentation unter Verwendung von Mikroorganismen durchgeführt wird. Besonders bevorzugt ist die Fermentation unter Beifügung von "Koji" als einem der zu verwendenden Mikroorganismen, um die Verstärkung der Antitumor-Aktivität zu erzielen. Nach vollständigem Ablauf eines derartigen Fermentationsschritts wurden die Ausgangsmaterialien pulverisiert.

Für die Pulverisierung kann eine kommerziell erhältliche Pulverisermühle verwendet werden, wobei vorzugsweise jedoch eine Maschine vermieden werden soll, die während der Pulverisierung hohe Temperaturen erzeugt. Dementsprechend bevorzugt für die Pulverisierung ist die Verwendung einer Steinmühle, da mit dieser keine hohen Temperaturen erzeugt werden.

Als Ausgangsmaterial verwendeten Pilze, die dem Rötvorgang und dem Fermentationsschritt unterworfen wurden sind, werden anschließend einer weiteren Behandlung unterworfen, um sie zu einem ölichen Agens zu machen. Das Verfahren zur Herstellung des ölichen Agens umfaßt das Einschließen des oben genannten feinen Pulvers nach der Fermentation mit einer ölichen Komponente aus Sesam, auf den ein Rötvorgang mittels ferner IR-Strahlung angewandt worden ist.

Als zu verwendende ölige Komponente zur Herstellung des ölichen Agens kann ein Öl (im Nachfolgenden als Sesampasten-Öl bezeichnet) verwendet werden, das von geröstetem Sesam gewonnen wurde. Das Sesampasten-Öl wird erhalten, indem man rohen Sesam dem Rötvorgang mittels ferner IR-Strahlung bei einer Temperatur von nicht mehr als 100°C, langsam aber über einen langen Zeitraum unterwirft, und den Sesam nach dem Rötvorgang zermahlt und komprimiert. In einem derartigen Sesampasten-Öl verbleiben feste Partikel, die beim Zermahlen gebildet worden sind, so daß das Produkt eine pastenartige Erscheinungsform hat.

Zu einem Sesampasten-Öl werden die pulverisierten Pilze nach der Fermentation gegeben, um die fein pulverisierten Pilze mit der ölichen Komponente des Sesams einzuschließen. Dadurch kann die Permeationskraft der Pilze in die Zellen an der erkrankten Stelle verstärkt werden im Vergleich zu der Permeationskraft ohne das Einschließen der Pilze mit dem pastösen Öl. Deshalb ist dieser Schritt bevorzugt; um eine wirksame Target-Richtungsweisung in bezug auf das Arzneimittel-Abgabe-System (DDS, drug delivery system), das in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat, zur Verfügung zu stellen.

Dieser Schritt der Herstellung des ölichen Agens ist bevorzugt. Inhärennt ist es bevorzugt, einen solchen Schritt durchzuführen, aber falls es Schwierigkeiten gibt, diesen Schritt zur Herstellung des ölichen Agens durchzuführen, kann er auch weggelassen werden. Der Grund liegt darin, daß auch die beiden vorhergehenden Schritte allein, d. h. der Rötvorgang mittels ferner IR-Strahlung und der Fermentationsschritt, eine signifikante Wirkung auf die Verstärkung der Antitumor-Aktivität haben, selbst wenn der letzte Schritt, das öliche Agens herzustellen, weggelassen worden ist.

Bei dem letzten Schritt, das öliche Agens herzustellen, können bevorzugte Ergebnisse dadurch erzielt werden, daß ein Mischöl aus dem oben genannten Sesampasten-Öl und einem aus rohem Sesam gewonnenen Öl (bei einem geeigneten Mischungsverhältnis) verwendet wird.

Bei dem Beimischen des aus rohem Sesam gewonnenen Öls wird die Größe eines Öltropfens verringert, so daß die Penetrationskraft auf die Targetzellen deutlich erhöht werden kann im Vergleich zu dem Fall, in dem die Pilze nur mit dem Sesampasten-Öl, das eine hohe Viskosität und eine große Öltropfengröße hat, eingeschlossen werden.

Wenn im Vorangegangenen von Öl die Rede gewesen ist, das aus rohem Sesam gewonnen wird, dann ist damit Öl gemeint, das dadurch erhalten wurde, daß roher Sesam als solcher gemahlen wurde und das resultierende Material komprimiert wurde. Die festen Partikel wurden dann entfernt, so daß dieses Öl einem kommerziell erhältlichen Sesamöl entspricht.

Das Verhältnis, in dem das Sesampasten-Öl und das gerade erwähnte Sesamöl aus rohem Sesam gemischt werden, hängt von der Menge des anfänglich verwendeten feinen Pulvers ab, das zugesetzt werden soll. Bevorzugtweise werden 1-3 Gewichtsteile Sesamöl zu einem Gewichtsteil Sesampasten-Öl gegeben. Das Mischungsverhältnis zwischen Mischöl und dem verwendeten feinen Pulver kann bei etwa 4-5 Gewichtsteilen des feinen Pulvers pro etwa einem Gewichtsteil des Mischöls liegen.

Die Pilze, deren Antitumor-Aktivitäten nach dem oben beschriebenen Verfahren verstärkt worden sind, wurden zu einem System gegeben, das durch Bestrahlung von Docosahexaensäure mit UV-Strahlung Lipid-Peroxide bildet, woraufhin die Menge der gebildeten Lipid-Peroxide bestimmt/untersucht wurde. Die Antitumor-Wirkungen der Pilze wurden auch mittels klinischer Versuche nach innerer Verabreichung gemessen.

Um die Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität zu vergleichen, wurde die gebildete Menge der Lipid-Peroxide und die Wirksamkeit in klinischen Versuchen untersucht hinsichtlich der Fälle, bei denen die Pilze nur dem Rötvorgang mittels ferner IR-Strahlung unterworfen worden sind, bei denen die Pilze nur der Fermentation mit einem Polysaccharid-abbauenden Enzym unterworfen worden sind, bei denen die Pilze nur der "Koji"-Fermentation unterworfen worden sind, bei denen die Pilze sowohl dem IR-Rötvorgang als auch der "Koji"-Fermentation unterworfen worden sind, und bei denen die Pilze überhaupt nicht behandelt worden sind.

Zur Durchführung der Fermentation mittels Polysaccharid-abbauenden Enzymen können verschiedene Enzyme verwendet werden. Bevorzugt ist jedoch eine Hemicellulase, die auch im vorliegenden Beispiel verwendet wurde.

Bei den eben beschriebenen Versuchen, bei denen die Pilze nur einem Behandlungsschritt, zwei Behandlungsschritten, oder gar keinem Behandlungsschritt unterworfen worden waren, war das verwendete Material zu dem Zeitpunkt, während diese Behandlungsschritte durchgeführt worden sind, jeweils ein feines Pulver.

Das Ausmaß der Pulverisierung der jeweiligen Proben wurde so eingestellt, daß die durchschnittliche Partikelgröße jeweils die gleiche war, um Wirkungen aufgrund der Partikelgröße des Pulvers auszuschließen. In dem Fall, da die Pilze nicht behandelt wurden, wurde der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) im Rohzustand und sein verkleinert verwendet, während alle übrigen Pilze als feine Pulver, erhalten nach einem Trocknungsvorgang, verwendet wurden.

Die Messung der gebildeten Menge von Lipid-Peroxid wurde wie folgt durchgeführt. Eine vorbestimmte Menge Docosahexaen-Säure wurde in mehrere Teströhren gegeben. Abgewogene Mengen Pilze wurden der Docosahexaen-Säure zugegeben und mit dieser vermischt. Das Gemisch in den Teströhren wurde mit UV-Strahlung bestrahlt, und die Menge der gebildeten Lipid-Peroxide wurde gemessen.

Docosahexaen-Säure wurde verwendet, indem vorher eine verdünnte Lösung hergestellt wurde, bei der die Ausgangsflüssigkeit zehnmal mit Ethanol verdünnt wurde, und die verdünnte Lösung weiter verdünnt wurde, so daß sie eine Eindkonzentration mit einer Verdünnung, die 200-fach war, hatte.

Die Pilzproben, die den oben beschriebenen Behandlungsschritten (einem, zwei, keinem) unterworfen wurden, wurden in Ethanol gegeben, so daß die Konzentration der Pilze 60 mg/ml betrug. Der Ethanol wurde bei Raumtemperatur 2-4 Wochen stehen gelassen, so daß eine Extraktion mit Ethanol erfolgte. Als Probe für den Test wurde ein Extrakt verwendet, der auf eine Eindkonzentration von 0,6 mg/ml verdünnt worden war.

Durch Mischen von 0,05 ml verdünnter Docosahexaensäure-Lösung, hergestellt wie oben beschrieben, 0,1 ml einer Pilzprobe und 0,85 ml Ethanol in einem Teströhren betrug das Reaktionsvolumen 1 ml. Dieses Teströhren wurde 3 Stunden mit UV-Licht bestrahlt, so daß Lipid-Peroxid gebildet wurde. Das gebildete Lipid-Peroxid wurde mittels der TBA-Reaktion (Thiobarbitursäure-Reaktion) gemessen.

Durch Erhitzen des gebildeten Lipid-Peroxids unter sauren Bedingungen wurde freigesetzter Malondialdehyd (MDA) mit Thiobarbitursäure (TBA) umgesetzt. Die gebildete Substanz mit maximaler Absorption wurde bestimmt, so daß die Menge an gebildetem Lipid-Peroxid indirekt ermittelt werden konnte.

Zur Durchführung der TBA-Reaktion wurden 0,2 ml einer 7%-igen Lösung von SDS, 2 ml 0,1 N HCl, 0,3 ml Phosphorwolframsäure und 1 ml eines Reagens, hergestellt durch Mischen von 0,67%-iger TBA mit Lissigsäure im Verhältnis 1 : 1, den jeweiligen Teströhren, die zuvor mit UV-Licht bestrahlt worden waren, zugesetzt. Die TBA-Reaktion wurde durchgeführt, indem die Röhrchen 12 Minuten nach Zugabe der oben genannten Lösungen bei 95°C gehalten wurden.

Anschließend wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, die TBA-Reaktionsschicht mit n-Butylalkohol extrahiert, und das fluorospektrometrische Verfahren auf die n-Butylalkohol-Phase angewendet, so daß die oben erwähnte MDA-Menge gemessen werden konnte. Zur Durchführung der Messung wurde Licht einer Wellenlänge von 515 nm als Anregungslicht verwendet. Die Fluorometrie erfolgte bei einer Wellenlänge von 535 nm. Das verwendete Fluorospektrophotometer war das Gerät F2000 von Hitachi Ltd. mit einem 400 V Photomultiplier.

Um die Wirkung der Docosahexaen-Säure auf die Pilze zu bestimmen, die zuvor in dem Lipid-Peroxid-System mit UV-Strahlung behandelt worden waren, wurden die Pilze bezüglich des MDA-Wertes (entspricht der Menge MDA, durch Absorption gezeigt), gemessen nach dem oben beschriebenen Verfahren, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Andererseits wurden klinische Versuche für Brustkrebs, Magenkrebs und Lungenkrebs mit den oben beschriebenen Pilzen durchgeführt (PORIA (BUKURYO), Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), Pilz Maitake (MATORAKE), schwarz (Kuromaitake), [Schnecke-Maitake (Yukiguni maitake)]) und POLYPORUS (CIIOREIMATAKE, Polyporus umbellatus FRIES). Diese Pilze waren entweder unbehandelt, nur mit Polysaccharid-abbauenden Enzymen fermentiert, "Koji"-fermentiert, mit ferner IR-Strahlung geröstet + "Koji"-fermentiert, mit ferner IR-Strahlung geröstet + "Koji"-fermentiert + der Behandlung zur Herstellung eines äugens Agens unterworfen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2, 3 und 4 dargestellt.

In Tabelle 2 sind die Auswirkungen der Behandlung mit den verschiedenen Pilzen auf Brustkrebs-Patienten gezeigt. Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Auswirkungen auf Magen- bzw. Lungenkrebs-Patienten, nachdem die Pilze den gerade zuvor beschriebenen Behandlungen unterworfen worden waren. In den Tabellen 2-4 sind auch die Wirksamkeitsverhältnisse angegeben, die wie folgt berechnet wurden:

Wirksamkeitsverhältnis =  $(\text{Anzahl der wirksamen} \pm \text{Anzahl der schwach wirksamen}) \times 100 / (\text{Anzahl der wirksamen} + \text{Anzahl der leicht wirksamen} + \text{Anzahl der nicht-wirksamen})$

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

## Wirkungen verschiedener Pilze auf die Erzeugung von MDA

Art der Behandlung	Getestete Probe	MDA-Wert (Durchschnitt)	Reihenfolge
	Kontrolle (ohne Pilz)	115	-
Keine Behandlung	Poria	269	4
	Agaricus Pilz	283	3
	Polyporus umbellatus	439	1
	Fries	398	2
	Maitake Pilz (schwarz)	218	5
	Matsutake Pilz	189	6
	Shiitake Pilz		
Rösten mit ferner IR-Strahlung	Poria	288	4
	Agaricus Pilz	341	3
	Polyporus umbellatus	536	1
	Fries	490	2
	Maitake Pilz (schwarz)	271	5
	Matsutake Pilz	233	6
	Shiitake Pilz		
Fermentation mit Polysacharid-abbauendem Enzym	Poria	284	5
	Agaricus Pilz	375	3
	Polyporus umbellatus	551	1
	Fries	525	2
	Maitake Pilz (schwarz)	304	4
	Matsutake Pilz	265	6
	Shiitake Pilz		
"Koji"-Fermentation	Poria	296	5
	Agaricus Pilz	399	3
	Polyporus umbellatus	594	1
	Fries	528	2
	Maitake Pilz (schwarz)	302	4
	Matsutake Pilz	280	6
	Shiitake Pilz		
Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation	Poria	334	6
	Agaricus Pilz	489	3
	Polyporus umbellatus	799	1
	Fries	768	2
	Maitake Pilz (schwarz)	412	4
	Matsutake Pilz	381	5
	Shiitake Pilz		
Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation + Behandlung zum öligen Agens	Poria	362	6
	Agaricus Pilz	509	3
	Polyporus umbellatus	827	1
Behandlung zum öligen Agens	Fries	792	2
	Maitake Pilz (schwarz)	430	4
	Matsutake Pilz	397	5
	Shiitake Pilz		

60

Die Pilze wurden jeweils in einer Menge von 6 mg/ml zugesetzt.

Tabelle 2

## Wirkungen verschiedener Pilze auf Brustkrebs-Patienten

Art der Behandlung	Probe	Brustkrebs (200 Personen)			Wirksamkeitsverhältnis (%)
		wirksam	schwach wirksam	unwirksam	
Keine Behandlung	Poria	0	3	37	7.5
	Agaricus Pilz	1	2	37	7.5
	Maitake Pilz	1	3	36	10.0
Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym	Poria	1	4	35	12.5
	Agaricus Pilz	2	6	32	20.0
	Maitake Pilz	4	5	31	22.5
"Koji"-Fermentation	Poria	1	5	34	15.0
	Agaricus Pilz	3	7	30	25.0
	Maitake Pilz	4	6	30	25.0
Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation	Poria	2	4	34	15.0
	Agaricus Pilz	4	6	30	25.0
	Maitake Pilz	12	7	31	47.5
Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation + Behandlung zum öligen Agens	Poria	3	5	32	20.0
	Agaricus Pilz	6	8	26	35.0
	Maitake Pilz	14	9	17	57.5

Die Zahl in Klammern bedeutet die Anzahl der insgesamt getesteten Personen.

Wirksamkeitsverhältnis = (Anzahl der wirksamen + Anzahl der schwach wirksamen Proben) x 100 %/Anzahl aller Proben

Die Tabellen 3 und 4 sind entsprechend zu lesen.

Tabelle 3

Wirkungen verschiedener Pilze auf Magenkrebs-Patienten

5	Art der Behandlung	Probe	Magenkrebs (150 Personen)			Wirksamkeitsverhältnis (%)
			Wirksam	schwach wirksam	unwirksam	
10	Keine Behandlung	Poria	0	2	28	6.7
		Agaricus Pilz	0	2	28	6.7
		Maitake Pilz	1	1	28	6.7
15	Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym	Poria	2	1	27	10.0
		Agaricus Pilz	2	3	25	16.7
		Maitake Pilz	3	3	24	20.0
20	"Koji"-Fermentation	Poria	1	2	27	10.0
		Agaricus Pilz	2	4	24	20.0
		Maitake Pilz	3	5	22	26.7
25	Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation	Poria	1	3	26	13.3
		Agaricus Pilz	3	5	22	26.7
		Maitake Pilz	5	7	18	40.0
30	Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation + Behandlung zum ölichen Agens	Poria	1	4	25	16.7
		Agaricus Pilz	4	7	19	36.7
		Maitake Pilz	6	8	16	46.7

Die Zahl in Klammern bedeutet die Anzahl der insgesamt getesteten Personen.

40

45

50

55

60

65

Tabelle 4

Wirkungen verschiedener Pilze auf Lungenkrebs-Patienten

Art der Behandlung	Probe	Lungenkrebs (100 Personen)			Wirksamkeitsverhältnis (%)
		Wirksam	schwach wirksam	unwirksam	
Keine Behandlung	Poria	0	1	19	5.0
	Agaricus Pilz	0	2	18	10.0
	Maitake Pilz	1	1	18	10.0
Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym	Poria	1	1	18	10.0
	Agaricus Pilz	1	2	17	15.0
	Maitake Pilz	3	4	13	35.0
"Koji"-Fermentation	Poria	1	2	17	15.0
	Agaricus Pilz	1	3	16	20.0
	Maitake Pilz	3	5	12	40.0
Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation	Poria	2	1	17	15.0
	Agaricus Pilz	3	3	14	20.0
	Maitake Pilz	4	5	11	45.0
Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation + Behandlung zum ölichen Agens	Poria	2	2	16	20.0
	Agaricus Pilz	3	4	13	35.0
	Maitake Pilz	5	5	10	50.0

### Die Zahl in Klammern bedeutet die Anzahl der insgesamt getesteten Personen.

Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß der MDA-Wert (der ein Index der gebildeten Menge an Lipid-Peroxid ist) größer wird bei einer Art von Pilz, wenn das Rösten mit IR-Strahlung erfolgt im Vergleich zu ungeröstetem Pilz. Der MDA-Wert steigt auch bei einer Art von Pilz, wenn die Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym erfolgte im Vergleich zu nur mit IR-Strahlung geröstetem Pilz. Der MDA-Wert steigt auch bei der "Koji"-Fermentation relativ zu der Fermentation mit dem Polysaccharid-abbauenden Enzym, aber auch wenn die Pilze mit IR-Strahlung geröstet und anschließend "Koji"-fermentiert wurden, im Vergleich zu nur "Koji"-fermentierten Pilzen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Pilze einer bestimmten Art sowohl mittels IR-Strahlung geröstet als auch "Koji"-fermentiert und dem Verfahren zum Herstellen eines ölichen Agens unterworfen worden waren.

Diese oben aufgezeigte Tendenz ist unabhängig von der Art des Pilzes, der in dem Test verwendet wurde. Eine Ausnahme diesbezüglich besteht nur für PORIA (BUKURYO), bezüglich des Röstens mittels ferner IR-Strahlung und der Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym. Eine weitere Ausnahme ist der Pilz Matsutake (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake) bezüglich der Fermentationen mit Polysaccharid-abbauendem Enzym und der "Koji"-Fermentation.

Im wesentlichen derselbe (genaugenommen ist einer der Werte von zwei Verfahren etwa 1% größer als der andere) MDA Wert wird erhalten nach Rösten mit IR-Strahlung und Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym bei dem Pilz PORIA (BUKURYO). Bei dem Pilz Matsutake (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake) ist der MDA-Wert ebenfalls im wesentlichen derselbe, egal ob die Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym erfolgte oder ob eine "Koji"-Fermentation durchgeführt wurde.

Andererseits ist den Tabellen 2-4 zu entnehmen, daß die Wirksamkeitsverhältnisse in bezug auf Brustkrebs-, Magenkrebs- und Lungenkrebs-Patienten bei einer Art von Pilz in folgender Reihenfolge größer werden: unbehandelter Pilz < Fermentation mit Polysaccharid-abbauendem Enzym < "Koji"-Fermentation < Rösten mit IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation < Rösten mit IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation + Behandlung zum ölichen Agens.

Aus Tabelle 2 läßt sich beispielsweise für PORIA (BUKURYO) entnehmen, daß das Wirksamkeitsverhältnis im unbehandelten Fall bei 7,5% liegt, während es für den Fall, daß der Pilz 3-fach (Rösten mit IR-Strahlung, "Koji"-Fermentation, Behandlung zum ölichen Agens) behandelt ist, bei 20% liegt. D. h., es wird eine Verbesserung um einen Faktor von etwa 3 erzielt. Bei dem Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) vergrößert sich das Wirksamkeitsverhältnis von 7,5% auf 35%, d. h. etwa 4,9-fach. Für den Pilz Maitake (MAITAKE) erhöht sich das Wirksamkeitsverhältnis drastisch, d. h. 5,75-fach, von 10% auf 57,5%. Diese Tendenzen sind in ähnlicher Form auch den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

Diese Ergebnisse beweisen, daß die Dreifachbehandlung der Pilze eine wirksame Methode ist, die Antitumor-Aktivität der Pilze/von Pilzen zu manifestieren bzw. zu verstärken, d. h., es ist ein Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität.

Tabelle 5

Menge an freiem  $\beta$ -Glucan in den jeweiligen Pilzen, entweder unbehandelt oder geröstet und "Koji"-fermentiert

Art der Behandlung	Probe	Wirksamkeit von $\beta$ -Glucan
Keine Behandlung	Agaricus Pilz (AGARIKUSUTAKE) Maitake Pilz (MAITAKE; schwarz)	9.0 g/100 g 24.4 g/100 g
Rösten mit ferner IR-Strahlung + "Koji"-Fermentation	Agaricus Pilz (AGARIKUSUTAKE) Maitake Pilz (MAITAKE; schwarz)	14.2 g/100g 30.4 g/100 g

Andererseits wurde die Menge an freiem  $\beta$ -Glucan als einen wirksamen Bestandteil mit Antitumor-Aktivität im Fall behandelter und unbehandelter Tumore gemessen. Die verwendeten Pilze waren wiederum der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), der Pilz Maitake (MAITAKE, der schwarze Maitake (Kuromaitake)). Beide zeigten große Wirksamkeitsverhältnisse (siehe Tabellen 2-4). Die Analysen wurden durchgeführt am Zentrum für Lebensmittelanalyse Suita, Osaka, Japan. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Bei beiden Pilzen war die Menge an freiem  $\beta$ -Glucan erhöht, wenn die Pilze 2-fach (Rösten mit IR-Strahlung und "Koji"-Fermentation) behandelt waren. Dieselben Ergebnisse lassen sich auch erzielen mit POLYPORUS (CIIOREI-MAITAKE), Polyporus umbellatus (RPIES). Andererseits zeigen auch die Ergebnisse der klinischen Versuche in den Tabellen 2-4, daß die Antitumor-Wirkungen größer sind, wenn die Pilze 2-fach (Rösten mit IR-Strahlung und "Koji"-Fermentation) behandelt sind, als wenn sie unbehandelt sind.

Wenn man die Ergebnisse aus den Tabellen 2-4 und der Tabelle 5 gemeinsam untersucht, kann man folgern, daß die  $\beta$ -Glucane verantwortlich sind für die Antitumor-Aktivität der Pilze, und daß die Antitumor-Wirkungen insbesondere dann deutlich manifestiert werden, wenn die Menge an freiem  $\beta$ -Glucan groß ist.

Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat weiterhin herausgefunden, daß die  $\beta$ -Glucane mit Antitumor-Wirkung in nicht-behandelten Pilzen in einer unbeweglichen Form vorliegen, dadurch daß sie unter Bildung einer Kette aneinander gebunden sind. Diese Form wird als nicht-aktivierter Zustand bezeichnet. Wenn solche (nichtbehandelten) Pilze oral verabreicht werden, kann diese Kette im Magensaft einer gewöhnlichen Person nicht aufgebrochen werden, so daß sich die Antitumor-Wirkung nicht zeigen läßt. Die Erhöhung der Menge an freiem  $\beta$ -Glucan wirkt sich jedoch drastisch auf die Manifestation der Antitumor-Wirkung aus.

Die Zusammensetzung, die durch die Dreifachbehandlung der Pilze (Behandlung durch Rösten mit IR-Strahlung, Fermentationsschritt und der Schritt, ein öliges Agens herzustellen; diese 3 Schritte machen das erfundungsgemäße Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität aus) hergestellt wird ist, wie in Tabelle 5 gezeigt, eine Zusammensetzung in der die Menge an freiem  $\beta$ -Glucan erhöht ist, und die nach oraler Verabreichung eine wirksame Antitumor-Aktivität aufweist (Tabellen 2-4). Zusammensetzungen, die behandelte Pilze enthalten, zeigen eine deutlich verstärkte Antitumor-Aktivität im Vergleich zu Zusammensetzungen, die Pilze enthalten, die unbehandelt geblieben sind.

Tabelle 1 läßt sich entnehmen, daß die Rangfolge der MDA-Werte für die einzelnen Pilze bei den verschiedenen Gruppen von Behandlungen (0, 1, 2 oder 3 Behandlungen) unterschiedlich sind. Tabelle 1 zeigt für die Pilze PORIA (BUKURYO), Matsutake (MATSUTAKE) und Shiitake (SHIITAKE), daß die Möglichkeit besteht, die Reihenfolge zu ändern, d. h., die Wirksamkeit der Antitumor-Aktivität bei den drei Behandlungsmethoden unbehandelt, "Koji"-fermentiert, IR geröstet + "Koji"-fermentiert ist nicht immer in derselben Reihenfolge.

Beispielsweise läßt sich Tabelle 1 entnehmen, daß für den unbehandelten Pilz die Antitumor-Aktivität in folgender Reihenfolge größer wird: Shiitake (SHIITAKE) < Matsutake (MATSUTAKE) < PORIA (BUKURYO). Andererseits ist die Reihenfolge nach Behandlung der Pilze durch Rösten mit IR-Strahlung und "Koji"-Fermentation bezüglich ihrer Antitumor-Aktivität wie folgt: PORIA (BUKURYO) < Shiitake (SHIITAKE) < Matsutake (MATSUTAKE). Auf jeden Fall zeigen die oben diskutierten Ergebnisse, daß das erfundungsgemäße Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität von Pilzen tatsächlich einen, die Antitumor-Aktivität verstärkenden Effekt hat, und daß sich die Reihenfolge beim MDA-Wert der einzelnen Pilze ändern kann in Abhängigkeit davon, welche Behandlung an den Pilzen vorgenommen wurde und ob überhaupt eine Behandlung erfolgte.

Im Bereich der chinesischen Medizin, die von natürlichen Rohdrogen Gebrauch macht, gibt es häufiger Mittel, die keine genügend große Menge an stabilem Wirkstoff sicherstellen können, auch nicht wenn es ein Pilz mit hoher Antitumor-Aktivität ist. Wenn jedoch das Verfahren der vorliegenden Erfindung durchgeführt wird, ist es möglich, Pilze zu verwenden, die eine genügend große Menge an stabilem Wirkstoff bereitstellen. Somit ist eine Auswirkung der vorliegenden Erfindung, daß genügend Wirkstoff verfügbar ist, und daß das Produkt billiger wird, so daß viele Personen in den Genuß der Antitumor-Wirkungen der Pilze gelangen.

Wie schon mehrfach erwähnt, ist das am meisten bevorzugte Verfahren der vorliegenden Erfindung ein solches, bei dem die Pilze sowohl geröstet als auch fermentiert und anschließend ölig gemacht werden. Aber auch nur einfach oder zweifach behandelte Pilze (z. B. nur geröstet oder nur mit Polysaccharid-abbauendem Enzym fermentiert oder nur "Koji"-fermentiert, oder nur geröstet + fermentiert) weisen eine erhöhte Antitumor-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Pilzen auf.

Das bedeutet, daß im Falle von Gründen, das Verfahren zum Herstellen des öligen Agens aufgrund von apparativen Voraussetzungen nicht durchführen zu können, können die Röstbehandlungen mit ferner IR-Strahlung und die Fermentation mit Mikroorganismen in Kombination ausgeführt werden, und die Antitumor-Aktivität kann dennoch wirkungsvoll verstärkt werden im Vergleich zu dem Fall der völlig ausbleibenden Behandlung.

Darüberhinaus kann für die Behandlung der Pilze ein dreistufiges Behandlungsverfahren, umfassend den Röstvorgang mittels ferner IR-Strahlung, die Fermentation, und die Behandlung zur Herstellung des öligen Agens, vorgesehen werden.

den. Alternativ können auch nur zwei Behandlungsschritte angewendet werden, nämlich das Rösten mit IR-Strahlung und eine Fermentationsbehandlung, wobei die Fermentationsbehandlung entweder eine Behandlung unter Verwendung von Mikroorganismen wie "Koji" oder Hefezellen ist, oder die Fermentationsbehandlung umfaßt zusätzlich zu dieser Fermentation mit Mikroorganismen auch noch die Fermentationsbehandlung mit Polysaccharid-abbauendem Enzym. 5

Für das Verfahren zur Herstellung des ölichen Agens als Teilschritt des Verfahrens zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität wird Sesampasten-Öl verwendet, das erhalten wird von geröstetem Sesam. Aber auch andere Pflanzenöle, erhältlich durch Rösten von Sojabohnen, Getreide, Saslor, Nachtkerzen, Reiskleie, Rübsamen etc. mittels ferner IR-Strahlung und anschließendem Drücken und Pressen finden Verwendung.

Die Zusammensetzungen, die Pilze enthalten, auf die das erfundungsgemäß Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität anzuwenden ist, können zusätzlich zu den Materialien, die durch Behandlung der Pilze mit dem erfundungsgemäß Verfahren erhalten werden, weitere Bestandteile enthalten, die keinerlei negative Effekte auf die Antitumor-Aktivität haben. Dazu zählen beispielsweise Vitamine. 10

Als Zusammensetzung einer solchen Konstitution kann eine Zubereitung mit einer den aktiven Sauerstoff supprimierenden Wirkung, die vom Erfinder der vorliegenden Erfindung entwickelt worden ist, formuliert werden. Die zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität behandelte, die Rohdroge enthaltende Zusammensetzung mit einer derartigen Konstitution kann tatsächlich zur Verfügung gestellt werden in einer Form, die durch Kapseln der Zusammensetzung in eine Geltinkapsel etc. leicht oral verabreicht werden kann. 15

Durch Verwendung eines geeigneten Trägers, eines Bindemittels etc. kann die Zusammensetzung tablettiert werden, oder sie kann als Granulat oder auch als Pille zubereitet werden. Während die vorliegende Erfindung ein Verfahren beschreibt, die Antitumor-Aktivität durch innere Verabreichung zu verstärken, liegt es im Bereich des Selbstverständlichen, daß auch Injektionszubereitungen erfundungsgemäß dazu geeignet sind, wenn die verwendeten Pilze dem erfundungsgemäß Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität ausgesetzt worden sind. Das erfundungsgemäß Verfahren ist im Laufe der Beschreibung mehrfach an Hand bestimmter Pilzarten beschrieben worden. Erfundungsgemäß können jedoch nicht nur die bereits genannten Pilze verwendet werden, sondern jegliche Pilze, solange sie  $\beta$ -Glucan enthalten. Weitere Beispiele für Pilze sind der Pilz Shimejitate (SHIMEJITAKE, Lyophyllum decastes) und der Pilz Enokitake (ENOKITAKE, Flammulina velutipes), etc. 20

Auch Rohdrogen, die andere Polysaccharide als  $\beta$ -Glucan mit Antitumor-Aktivität enthalten, können verwendet werden. Außerdem kann die vorliegende Erfindung als Verfahren zur Verstärkung der Manifestation von Antitumor-Wirkungen bei Substanzen in pflanzlichen Natur- oder auch Kultur-Produkten einschließlich Pilzen, die wie  $\beta$ -Glucan Antitumor-Aktivität aufweisen, verwendet werden. 30

## Ausführungsform 2

In der vorliegenden Ausführungsform werden ein Verfahren zur Ermittlung der Wirksamkeit auf die Antitumor-Aktivität einer Rohdroge und ein weiteres Verfahren zur Ermittlung der Antitumor-Wirksamkeit von behandelten Rohdrogen beschrieben. 35

Zu dem System, bei dem durch UV-Strahlung Lipid-Peroxide wie oben beschrieben gebildet werden, wird eine Rohdroge, z. B. ein Pilz, gegeben, um die Antitumor-Aktivität zu ermitteln. Die gebildete Menge an Lipid-Peroxid wird untersucht. Wenn man die Pilze in zunehmenden Mengen zusetzt, zeigt der Pilz, der eine Tendenz hat, die gebildete Menge an Lipid-Peroxid drastisch zu erhöhen, eine wirksame Antitumor-Aktivität, wenn er verabreicht wird. 40

Das heißt, wenn Pilz A bei einer Konzentration von 1% die Menge a an Lipid-Peroxid und bei einer Konzentration von 2% eine Menge von mehr als 2a an Lipid-Peroxid erzeugt, dann kann dieser Pilz A als ein Pilz mit einem wirksamen Antitumor-Effekt ermittelt werden, wenn er oral verabreicht wird. Insbesondere ist der Pilz A im Vergleich zu Pilz B, der bei einer Konzentration von 1% die Menge a an Lipid-Peroxid und bei einer Konzentration von 2% nur eine Menge von 2a an Lipid-Peroxid erzeugt, eine wirksame Antitumor-Substanz. Das heißt, es können viele verschiedene Pilze diesem Versuchssystem ausgesetzt werden, um zu untersuchen, ob das vergrößerte Verhältnis der gebildeten Menge an Lipid-Peroxid im Vergleich zu dem Verhältnis der Konzentration der zugesetzten Pilze groß oder klein ist. Somit kann eine gewisse Reihenfolge bei der Wirksamkeit, Antitumor-Wirkung zu zeigen, ermittelt werden. 45

Nachfolgend werden die beiden Verfahren von Ausführungsform 2 gemäß vorliegender Erfindung an Hand oben erwähnter Beispiele näher erläutert. Wenn die MDA-Werte bezüglich der jeweiligen Behandlungen in Tabelle 1 miteinander verglichen werden, läßt sich für alle untersuchten Fälle feststellen, daß die MDA-Werte nach einem, zwei oder drei Behandlungsschritten jeweils größer waren als im Falle der ausbleibenden Behandlung. 50

Ein Vergleich der Ergebnisse von nur dem Rötvorgang unterworfenen Pilzen mit nur "Koji"-fermentierten Pilzen, zeigt, daß letztere den größeren MDA-Wert aufweisen. Wenn sowohl "Koji"-Fermentation als auch der Rötvorgang mittels ferner IR-Strahlung durchgeführt wurden, ist der MDA-Wert größer als wenn nur das eine oder nur das andere der beiden Verfahren durchgeführt worden ist. 55

Wenn die Pilze sowohl dem Rötvorgang als auch der "Koji"-Fermentation und dem Verfahren zur Herstellung eines ölichen Agens unterworfen worden sind, sind die MDA-Werte größer als wenn nur der Rötvorgang und die "Koji"-Fermentation stattgefunden haben. 60

Andererseits läßt sich dem Vergleich von Tabellen 2, 3 und 4 mit Tabelle 1 entnehmen, daß die klinischen Effekte bei Brust-, Magen- und Lungenkrebs umso größer sind, je größer die MDA-Werte in Tabelle 1 sind (jeweils bezogen auf eine bestimmte Art von Pilz, die einer bestimmten Behandlung unterworfen worden ist).

Aufgrund dieser Ergebnisse läßt sich die Größe des klinischen Effekts, d. h. die Wirksamkeit der Antitumor-Aktivität, durch Ermittlung des MDA-Wertes als ein Index ermitteln. Es läßt sich feststellen, daß die Behandlung, die einen großen MDA-Wert mit sich bringt, auch wirksam ist bezüglich der Antitumor-Wirkung. 65

Mit anderen Worten, wenn der MDA-Wert, der die gebildete Menge an Lipid-Peroxid anzeigt, groß ist, bedeutet das, daß die auf die Pilze angewendete Behandlung bezüglich ihrer Antitumor-Aktivität sehr wirksam gewesen ist.

Wie bereits gesagt, zeigen die Ergebnisse im Vergleich zwischen Tabelle 1 und Tabellen 2, 3 und 4, daß bei derselben

Behandlung derselben Art von Pilz die Größe des MDA-Wertes dem Wirksamkeitsverhältnis der klinischen Wirkungen entspricht.

Dementsprechend läßt sich für eine bestimmte Art von Pilz eine gute Antitumor-Aktivität erwarten, wenn der MDA-Wert hoch ist. Das bedeutet wiederum, daß klinische Versuche vermieden werden können und dennoch die Wirkung bzw. 5 Wirksamkeit der Antitumor-Aktivität verschiedener Pilze nach oraler Verabreichung zu bestimmen ist.

Wie bei Ausführungsform 1 gilt auch für Ausführungsform 2, daß jegliche Pilze verwendet werden können, solange sie  $\beta$ -Glucan enthalten.

Die vorliegende Erfindung kann darüber hinaus auch angewendet werden auf Pilze, die andere Polysaccharide als  $\beta$ -Glucan mit Antitumor-Aktivität enthalten. Außerdem kann die vorliegende Erfindung auch angewendet werden auf Rohdrogen wie natürliche oder kultivierte Produkte aus anderen Pflanzen als Pilzen, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität wie beispielsweise  $\beta$ -Glucan enthalten.

Im Laufe der vorangegangenen Beschreibung ist immer von der Verwendung von Docosahexaen-Säure die Rede gewesen. Es kann jedoch auch eine andere Fettsäure verwendet werden, beispielsweise eine ungesättigte Fettsäure, solange ihre Bestrahlung mit UV-Licht unter Zugabe der oben genannten Pilze zur Bildung von Lipid-Peroxiden führt. Die ungesättigte Fettsäure kann von einem lebenden Körper oder auch nicht von einem lebenden Körper, das heißt, eine synthetische Fettsäure sein. Voraussetzung ist nur, daß die Menge an gebildetem Lipid-Peroxid in einem Bereich liegt, so daß das erfundungsgemäße Verfahren Anwendung finden kann.

Durch Zugabe von carcinostatische Polysaccharide enthaltenden Pilzen zu dem Lipid-Peroxid bildenden System in verschiedenen Konzentrationen und durch Ermittlung der Mengen an gebildetem Lipid-Peroxid läßt sich eine geeignete 20 und durchschnittliche Dosis für die Verabreichung an Patienten mit einem malignen Tumor wie Krebs ermitteln, ohne klinische Versuche mit dem entsprechenden Pilz durchführen zu müssen.

Das Verhältnis zwischen Konzentration des Pilzes und MDA-Wert für eine bestimmte Art von Pilz wird somit erfaßt, und der MDA-Wert und seine Auswirkung in dem jeweiligen Zustand von mehr oder weniger fortgeschrittenem Krebs wurde für eine bestimmte Art von Pilz vorab in klinischen Versuchen bestätigt. Wenn die Konzentration eines bestimmten Pilzes zurückberechnet wird, so daß ein MDA-Wert erhalten wurde, der sich als wirksam herausgestellt hat in einem bestimmten Zustand von fortgeschrittenem Tumor wie Krebs etc., kann die durchschnittliche Dosis für die orale Verabreichung ohne weiteres an Hand der Konzentration des Pilzes ermittelt werden.

Gemäß der vorliegenden Erfindung läßt sich die Antitumor-Aktivität einer Rohdroge mittels eines allgemeinen Index wie des MDA-Werts vergleichen, so daß die Antitumor-Aktivitäten verschiedener Arten von Rohdrogen, die mittels klinischer Versuche verglichen worden sind, miteinander zu vergleichen sind, ohne klinische Versuche zu benötigen, d. h. ohne Patienten in Gefahren zu bringen.

Das heißt, die von dem Erfinder der vorliegenden Erfindung ermittelte Korrelation zwischen MDA-Wert und Antitumor-Aktivität von Rohdrogen ist so bedeutsam, daß sie für die wechselseitige Ermittlung einer großen Anzahl von Rohdrogen verwendet werden kann.

Erfindungsgemäß kann die Antitumor-Aktivität von Rohdrogen wie Pilzen bei innerer Verabreichung verstärkt werden, wenn das erfundungsgemäße Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität benutzt wird.

Erfindungsgemäß wurde auch gefunden, daß Rohdrogen wie Pilze, die unbehandelt nicht als wirksam angesehen werden, sehr wohl als Antitumor-Mittel Anwendung finden können aufgrund verstärkter Antitumor-Aktivität bei innerer Verabreichung, wenn die Rohdroge mit dem erfundungsgemäßen Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität behandelt worden ist.

Gemäß dem erfundungsgemäßen Verfahren zur Ermittlung der Antitumor-Wirkung der Behandlung durch Rohdrogen kann die Wirksamkeit bezüglich Antitumor-Aktivität durch verschiedene Behandlungsmethoden, angewendet auf die Rohdrogen, innerhalb einer kurzen Zeit auf einfache Art und Weise ermittelt werden.

Gemäß dem erfundungsgemäßen Verfahren zur Ermittlung der Antitumor-Wirksamkeit von Rohdrogen kann die Wirksamkeit der Rohdrogen bei oraler Verabreichung abgeschätzt werden, ohne klinische Versuche durchführen zu müssen. Im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, bei denen langwierige Tierversuche oder klinische Versuche erforderlich sind, kann die Suche nach Substanzen mit Antitumor-Wirksamkeit durch Absuchen einer riesigen Anzahl von Naturprodukten auf im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden einfache Art und Weise durchgeführt werden.

50

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität einer Rohdroge, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthält, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt: einen Schritt, die Rohdroge mit ferner IR-Strahlung zu rösten, und einen Fermentationsschritt mittels Zugabe von Mikroorganismen, so daß die Antitumor-Aktivität der Rohdroge im Vergleich zur unbehandelten Rohdroge verstärkt wird.
2. Das Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Rohdroge ein Pilz ist, der  $\beta$ -Glucan enthält.
3. Das Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Pilz ausgewählt ist aus folgender Gruppe: Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), Pilz Maitake (MAITAKE, Grifola frondosa), Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake), Pilz Matsutake, (MATSUMATAKE, Tricholoma matsutake), Pilz Shimejitate (SHIMEJITAKE, Lyophyllum decastes) und Pilz Enokitake (ENOKITAKE, Flammulina velutipes).
4. Das Verfahren nach Anspruch 3, wobei der verwendete Pilz der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) ist und dieser Pilz im rohen Zustand dem Röstvorgang mit ferner IR-Strahlung unterworfen wird.
5. Das Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren nach dem Fermentationsschritt einen zusätzlichen Schritt umfaßt, und wobei dieser Schritt ein Schritt zur Herstellung eines ölichen Agens ist, bei dem die fermentierte Rohdroge von einer ölichen Komponente eingeschlossen wird, die erhalten wurde von Pflanzen, insbesondere Sesam, durch Rösten mittels ferner IR-Strahlung.
6. Das Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Rohdroge ein Pilz ist, der  $\beta$ -Glucan enthält.
7. Das Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Pilz ausgewählt ist aus folgender Gruppe: Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE).

KUSUTAKE), Pilz Maitake (MAITAKE, Grifola frondosus), Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake), Pilz Matsutake, (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake), Pilz Shimejitaro (SHIMEJITAKE, Lyophyllum decastes) und Pilz Enokitake (ENOKITAKE, Flammulina velutipes).

8. Das Verfahren nach Anspruch 7, wobei der verwendete Pilz der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) ist und dieser Pilz im rohen Zustand dem Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung unterworfen wird. 5

9. Zusammensetzung, enthaltend eine in ihrer Antitumor-Aktivität verstärkte Rohdroge, wobei die Rohdroge mittels eines Verfahrens zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität in ihrer Antitumor-Aktivität verstärkt worden ist, wobei dieses Verfahren die Schritte umfaßt, die Rohdroge in einem Rötschritt mittels ferner IR-Strahlung zu rösten, und die Rohdroge in einem Fermentationsschritt unter Zugabe eines Mikroorganismus zu fermentieren, wodurch die Antitumor-Aktivität der Rohdroge im Vergleich zu der der nicht gerösteten und fermentierten Rohdroge verstärkt wird. 10

10. Die Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei die Rohdroge ein Pilz ist, der  $\beta$ -Glucan enthält. 15

11. Die Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei der Pilz ausgewählt ist aus folgender Gruppe: Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), Pilz Maitake (MAITAKE, Grifola frondosus), Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake), Pilz Matsutake, (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake), Pilz Shimejitaro (SHIMEJITAKE, Lyophyllum decastes) und Pilz Enokitake (ENOKITAKE, Flammulina velutipes). 20

12. Die Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei der verwendete Pilz der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) ist und dieser Pilz im rohen Zustand dem Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung unterworfen wird. 25

13. Das Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Verfahren nach dem Fermentationsschritt einen zusätzlichen Schritt umfaßt, und wobei dieser Schritt ein Schritt zur Herstellung eines öligen Agens ist, bei dem die fermentierte Rohdroge von einer öligen Komponente eingeschlossen wird, die erhalten wurde von Pflanzen, insbesondere Sesam, durch Rösten mittels ferner IR-Strahlung. 30

14. Das Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Rohdroge ein Pilz ist, der  $\beta$ -Glucan enthält. 35

15. Das Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Pilz ausgewählt ist aus folgender Gruppe: Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), Pilz Maitake (MAITAKE, Grifola frondosus), Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake), Pilz Matsutake, (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake), Pilz Shimejitaro (SHIMEJITAKE, Lyophyllum decastes) und Pilz Enokitake (ENOKITAKE, Flammulina velutipes). 40

16. Das Verfahren nach Anspruch 15, wobei der verwendete Pilz der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) ist und dieser Pilz im rohen Zustand dem Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung unterworfen wird. 45

17. Verfahren zur Ermittlung der Wirksamkeit einer Behandlung, die auf eine Rohdroge angewendet wird, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthält, auf die Antitumor-Aktivität, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt, die Rohdroge einem System zuzugeben, das durch Bestrahlung einer ungesättigten Fettsäure, vorzugsweise Docosahexaen-Säure, mit UV-Licht Lipid-Peroxide bildet, und dann die Auswirkung dieser Behandlung bezüglich der Verstärkung der Antitumor-Aktivität an Hand der gebildeten Menge an Lipid-Peroxid dann als groß zu ermitteln, wenn das Verhältnis der gebildeten Mengen an Lipid-Peroxid relativ zu dem Verhältnis der Konzentrationen der Rohdroge groß ist. 50

18. Das Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Rohdroge ein Pilz ist, der  $\beta$ -Glucan enthält. 55

19. Das Verfahren nach Anspruch 18, wobei der Pilz ausgewählt ist aus folgender Gruppe: Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), Pilz Maitake (MAITAKE, Grifola frondosus), Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake), Pilz Matsutake, (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake), Pilz Shimejitaro (SHIMEJITAKE, Lyophyllum decastes) und Pilz Enokitake (ENOKITAKE, Flammulina velutipes). 60

20. Das Verfahren nach Anspruch 19, wobei der verwendete Pilz der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) ist und dieser Pilz im rohen Zustand dem Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung unterworfen wird. 65

21. Verfahren zur Ermittlung der Wirksamkeit einer Rohdroge für die Ermittlung der Wirksamkeit eines Antitumor-Effekts, der von einer Rohdroge, die Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität enthält, gezeigt wird, ohne die Notwendigkeit zur Durchführung von klinischen Versuchen, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt, die Rohdroge einem System zuzugeben, das durch Bestrahlung einer ungesättigten Fettsäure, insbesondere Docosahexaen-Säure, mit UV-Licht Lipid-Peroxide bildet, und die Wirkung der Antitumor-Aktivität der Rohdroge bei oraler Verabreichung als groß zu ermitteln, wenn das Verhältnis der gebildeten Mengen an Lipid-Peroxid relativ zu dem Verhältnis der Konzentrationen der Rohdroge groß ist. 70

22. Das Verfahren nach Anspruch 21, wobei die Rohdroge, auf die das Verfahren, das die Schritte umfaßt, die Rohdroge in einem Rötschritt mittels ferner IR-Strahlung zu rösten, und die Rohdroge in einem Fermentationsschritt unter Zugabe eines Mikroorganismus zu fermentieren, angewendet wird, in ihrer Antitumor-Aktivität im Vergleich zu der der nicht gerösteten und fermentierten Rohdroge verstärkt ist. 75

23. Das Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Rohdroge ein Pilz ist, der  $\beta$ -Glucan enthält. 80

24. Das Verfahren nach Anspruch 23, wobei der Pilz ausgewählt ist aus folgender Gruppe: Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), Pilz Maitake (MAITAKE, Grifola frondosus), Pilz Shiitake (SHIITAKE, Cortinellus Shiitake), Pilz Matsutake, (MATSUTAKE, Tricholoma matsutake), Pilz Shimejitaro (SHIMEJITAKE, Lyophyllum decastes) und Pilz Enokitake (ENOKITAKE, Flammulina velutipes). 85

25. Das Verfahren nach Anspruch 24, wobei der verwendete Pilz der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) ist und dieser Pilz im rohen Zustand dem Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung unterworfen wird. 90

26. Das Verfahren nach Anspruch 21, wobei die Rohdroge, auf die das Verfahren zur Verstärkung der Antitumor-Aktivität, das nach dem Fermentationsschritt den zusätzlichen Schritt umfaßt, ein öliges Agens herzustellen, bei welchem Schritt die fermentierte Rohdroge von einer öligen Komponente eingeschlossen wird, die erhalten wurde von Pflanzen, insbesondere Sesam, durch Rösten mittels ferner IR-Strahlung, angewendet wird, in ihrer Antitumor-Aktivität im Vergleich zu der der nicht gerösteten, nicht fermentierten und nicht ölig gemachten Rohdroge verstärkt ist. 95

27. Das Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Rohdroge ein Pilz ist, der  $\beta$ -Glucan enthält. 100

# DE 199 44 695 A 1

28. Das Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Pilz ausgewählt ist aus folgender Gruppe: Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE), Pilz Maitake - (MATI'AKI), Grifola frondosa), Pilz Shiitake (SHIITAKE, *Coriinellus Shiitake*), Pilz Matsutake, (MAT'SUTAKI, *Tricholoma matsutake*), Pilz Shimejitate (SHIMEJITAKE, *Lyophyllum decastes*) und Pilz Enokitake (ENOKITAKE, *Flammulina velutipes*).

5 29. Das Verfahren nach Anspruch 28, wobei der verwendete Pilz der Pilz Agaricus (AGARIKUSUTAKE) ist und dieser Pilz im rohen Zustand dem Rötvorgang mit ferner IR-Strahlung unterworfen wird.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65